

УДК 576.893.1: 638.15-07

ЗАРАЖЕННОСТЬ СЕМЕЙ МЕДОНОСНОЙ ПЧЕЛЫ
(*APIS MELLIFERA*) МИКРОСПОРИДИЯМИ РОДА *NOSEMA*
(MICROSPORIDIA) НА ПАСЕКАХ ТОМСКОЙ ОБЛАСТИ

© Н. В. Островерхова,¹* О. Л. Конусова,¹ А. Н. Кучер,¹ А. В. Симакова,¹
Е. П. Голубева,¹ Т. Н. Киреева,¹ И. В. Шарахов^{1,2}

¹ Национальный исследовательский Томский государственный университет,
кафедра зоологии беспозвоночных,
пр. Ленина, 36, Томск, 634050

* E-mail: nvostrov@mail.ru

² Department of Entomology, Virginia Polytechnic Institute and State University,
Blacksburg, Virginia, USA
Поступила 06.10.2015

Исследована зараженность пчелосемей и пасек Томской обл. микроспоридиями рода *Nosema*, вызывающими опасное инвазионное заболевание медоносной пчелы — нозематоз. В период с 2012 по 2015 г. было исследовано 124 пчелосемьи с 64 пасек, из них нозематоз выявлен на 20 пасеках (31.3 % от общего количества) у 32 пчелосемей (25.8 % от общего количества). Наибольшее количество зараженных микроспоридиями рода *Nosema* пчелосемей и пасек наблюдалось в 2014—2015 гг. (более 40 %). Из общего числа зараженных нозематозом пчелиных семей в 84.4 % пчелосемей (с 16 пасек) зарегистрирован только возбудитель *Nosema apis*; в 9.4 % пчелосемей (с 2 пасек) выявлен более патогенный возбудитель нозематоза — *Nosema ceranae* и в 6.3 % пчелосемей (с 2 пасек) обнаружена ко-инфекция — регистрировались совместно *N. apis* и *N. ceranae*. Обсуждаются возможные причины распространения микроспоридий рода *Nosema*: климатические условия, недостаточный контроль ввозимых пчелиных семей на зараженность нозематозом и некоторые другие.

Ключевые слова: микроспоридии, *Nosema apis*, *Nosema ceranae*, медоносная пчела, *Apis mellifera*, Томская обл.

Микроспоридии, являясь широко распространенными внутриклеточными облигатными паразитами многих групп животных, в том числе и насекомых, всегда привлекали внимание исследователей как энтомопатогенные организмы. Одни из них рассматривались как агенты биологических методов борьбы с вредными видами, другие — как патогены хозяйственно значимых насекомых, вызывающие серьезные заболевания и наносящие урон пчеловодству и шелководству (Исси, 1986, 2002; Симакова, Панкова, 2008; Симакова и др., 2011; Andreadis et al., 2012; Лукьянцев, Симакова, 2014; Becnel, Andreadis, 2014; Токарев и др., 2015; Vavilova et al.,

2015). У медоносных пчел выделено 2 вида микроспоридий, относящихся к роду *Nosema* Naegeli, 1857 (*Nosema apis* Zander, 1909 и *N. ceranae* Fries, 1996) и вызывающих опасное заболевание — нозематоз.

Микроспоридия *N. apis* описана Цандером (Zander, 1909) более 100 лет назад и до недавнего времени считалась единственным специфическим паразитом медоносной пчелы *Apis mellifera* L. (Shafer et al., 2009; Chen, Huang, 2010). В 1996 г. был описан новый возбудитель нозематоза — *N. ceranae* (Fries et al., 1996), выделенный из азиатской пчелы *Apis cerana* Fabricius. Инфицирование медоносных пчел возбудителем *N. ceranae* было сначала обнаружено на Тайване, затем в Европе, Америке, Китае, Вьетнаме и в настоящее время регистрируется по всему миру (Fries et al., 2006; Higes et al., 2006; Huang et al., 2007; Chauzat et al., 2007; Klee et al., 2007; Paxton et al., 2007; Chen et al., 2008; Williams et al., 2008; Giersch et al., 2009; Higes et al., 2009; Chen, Huang, 2010; Fries, 2010; Santrac et al., 2010). В России этот возбудитель обнаружен впервые в Тюменской обл., затем и в других регионах страны (Зинатуллина и др., 2011, 2012; Чернышев, 2012). В Томской обл. первый случай заражения пчел микроспоридией *N. ceranae* зарегистрирован в 2013 г. (Островерхова и др., 2014).

Сравнительный геномный анализ двух видов рода *Nosema* показал значительное структурное сходство между геномами *N. apis* и *N. ceranae* (выявлено большое количество ортологичных генов и белков) (Cornman et al., 2009; Chen et al., 2013; Vida et al., 2014). Вместе с тем обнаружены и различия в структуре ряда генов, продукты которых вовлечены в некоторые биологические процессы, контролирующие врожденный иммунитет, энергетический обмен и другие процессы жизнедеятельности. Вероятно, генетические особенности двух видов рода *Nosema* могут определять различия в их распространении, развитии и влиянии на хозяина, а также могут обуславливать различный патогенез и специфику клинической картины заболеваний.

Микроспоридии *N. apis* и *N. ceranae* отличаются друг от друга прежде всего по патогенному влиянию на хозяина. Возбудитель *N. ceranae* рассматривается как более патогенный паразит медоносной пчелы по сравнению с *N. apis* (Paxton et al., 2007; Higes et al., 2008). Нозематоз, вызываемый *N. apis*, проявляется в основном дизентерией, инфекция ограничивается эпителием средней кишки (Fries, 1988). Возбудитель нозематоза *N. ceranae* с помощью молекулярных методов был обнаружен как в средней кишке, так и в других органах пчелы, и, в частности, мальпигиевых сосудах и гипофарингиальных железах (Chen et al., 2009). Болезнь, вызванная *N. ceranae* и названная нозематозом типа «С», характеризуется тем, что гибели особей и семьи пчел не предшествуют какие-либо видимые симптомы (Martin-Hernández et al., 2007; Higes et al., 2008). Однако существуют и другие точки зрения о влиянии возбудителя *N. ceranae* на здоровье и жизнеспособность медоносных пчел и их колоний. В частности, многими авторами описываются различные симптомы вызываемого им заболевания (Fries et al., 2006; Higes et al., 2006; Chauzat et al., 2007; Cox-Foster et al., 2007; Klee et al., 2007; Paxton et al., 2007; Chen et al., 2008; Higes et al., 2008; Williams et al., 2008; Invernizzi et al., 2009; Mulholland et al., 2012; Botias et al., 2013; Goblirsch et al., 2013; Büchler et al., 2014; Francis et al., 2014; Meixner et al., 2014a, b; Eiri et al., 2015; Huang et al., 2015; Milbrath

et al., 2015; Peng et al., 2015). Микроспоридия *N. ceranae* отличается высоким уровнем патогенности, а ее споры остаются жизнеспособными в течение длительного периода (Higes et al., 2010). Таким образом, заболевание пчел, вызываемое микроспоридией *N. ceranae*, является одной из причин массовой гибели на пасеках пчел и пчелиных семей (Cox-Foster et al., 2007; Higes et al., 2008; Genersch, 2010; Paxton, 2010; Higes et al., 2013).

В связи с этим актуальной задачей является дальнейшее изучение распространения нозематоза и оценка степени зараженности пчелосемей и пасек спорами ноземы, а также установление видовой принадлежности возбудителя у медоносной пчелы (*A. mellifera*) в различных регионах. Настоящее исследование посвящено анализу зараженности нозематозом пчелосемей и пасек Томской обл.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Для настоящего исследования были отобраны пчелы с 64 пасек, расположенные вблизи 47 населенных пунктов из следующих 11 районов Томской обл. — Парабельского, Молчановского, Колпашевского, Чайнского, Кривошеинского, Первомайского, Асиновского, Томского, Шегарского, Зырянского и Кожевниковского (рис. 1). Сборы (от 10 до 50 пчел, изъятых из 124 семей) проводились в течение всего пчеловодческого сезона в 2012—2015 гг. В общей сложности методами световой микроскопии (Воронин, Иесси, 1974) и молекулярной генетики было исследовано 1903 образца. Из брюшной полости каждой пчелы отделялась средняя кишка, одна часть которой использовалась для приготовления препаратов, а другая — для выделения ДНК. В случае выявления с помощью световой микроскопии в образце медоносной пчелы спор *Nosema*, проводилась полимеразная цепная реакция (ПЦР) для определения видовой принадлежности паразита.

Для выделения ДНК из средней кишки использовали модифицированный метод экстракции смесью гуанидинизотиоцианат-фенол-хлороформ (Островерхова и др., 2013). Выделенная ДНК анализировалась методом мультиплексной ПЦР с применением видоспецифичных праймеров для генов, кодирующих 16S рДНК *A. apis* (Apis 321-F/R) и *N. ceranae* (Mitoc 218-F/R) (Martin-Hernández et al., 2007; Hamiduzzaman et al., 2010). Использовались следующие последовательности праймеров:

Apis 321-Forward: 5' GGG GGC ATG TCT TTG ACG TAC TAT GTA;
Apis 321-Reverse: 5' GGG GGG CGT TTA AAA TGT GAA ACA ACT ATG;
Mitoc 218-Forward: 5' CGG CGA CGA TGT GAT ATG AAA ATA TTA A;
Mitoc 218-Reverse: 5' CCC GGT CAT TCT CAA ACA AAA AAC CG.

Продукты амплификации фракционировали в 1.0%-ном агарозном геле, окрашивали бромистым этидием, визуализировали в ультрафиолетовом свете и документировали с применением системы гель-документирования Gel-Doc XR+ (Bio-Rad, Foster City, CA, USA) и специальной программы ImageLab 2.0 для визуализации гель-электрофореза.

Для анализа многолетней динамики зараженности пчелосемей и пасек Томской обл. привлекались данные за 2009 и 2010 гг., полученные ОГБУ «Томская областная ветеринарная лаборатория» (ОГБУ ТОВЛ).

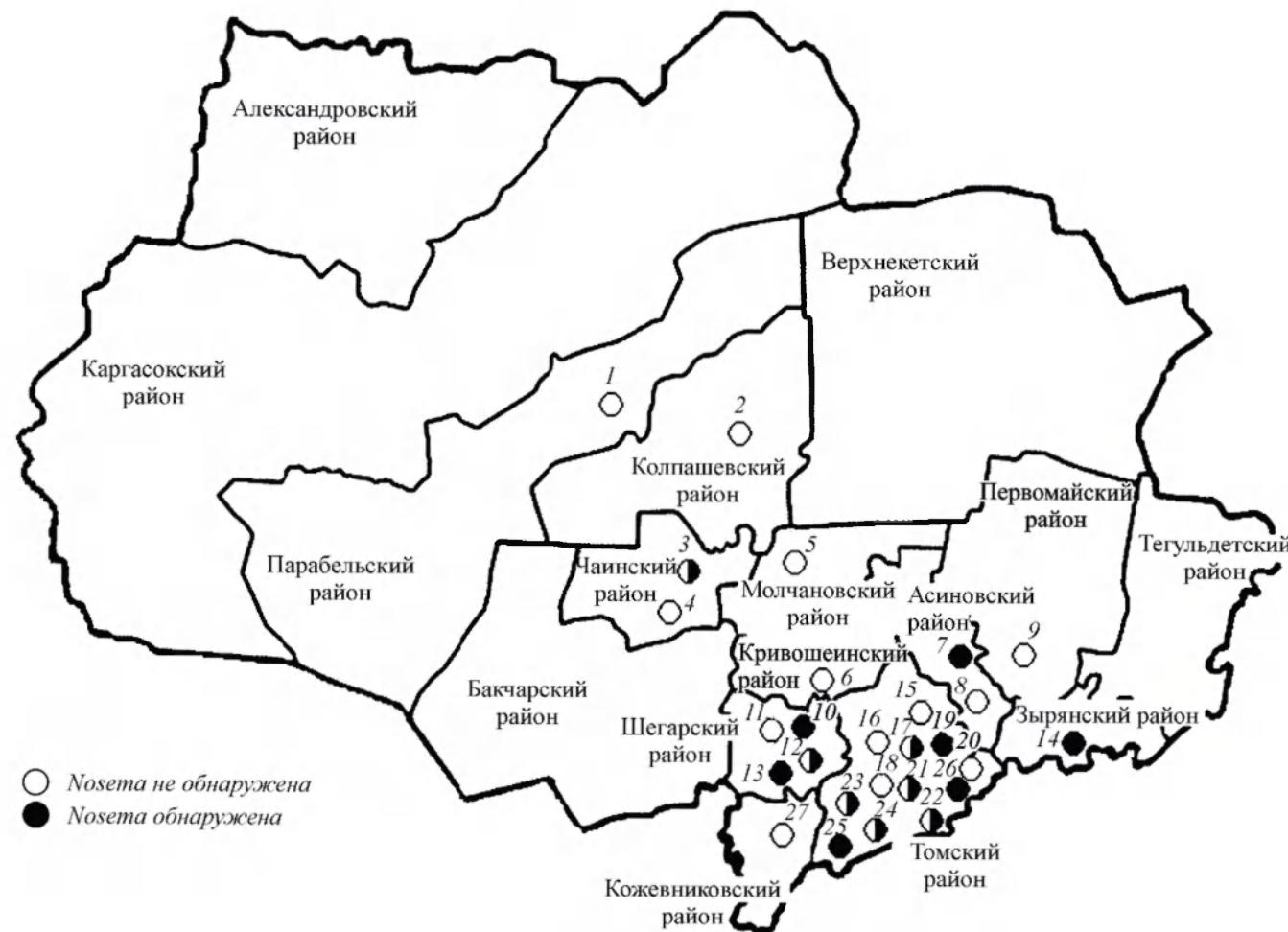


Рис. 1. Распространение возбудителя нозематоза *Nosema* на пасеках Томской обл. (указано зарегистрирован / не зарегистрирован возбудитель без учета частоты встречаемости).

1 — с. Парабель; 2 — окр. г. Колпашево; 3 — с. Подгорное; 4 — дер. Григорьевка; 5 — с. Могочино; 6 — окр. с. Кривошино; 7 — дер. Тихомировка; 8 — с. Цветковка; 9 — дер. Ломовицк; 10 — с. Новоильинка; 11 — села Монастырка и Новотроицкое; 12 — с. Каргала; 13 — с. Баткать; 14 — с. Зырянское; 15 — дер. Кусково; 16 — пос. Басандайка, с. Батурино; 17 — пос. Заречный (Малиновское сельское поселение), деревни Бодажково и Аркашово; 18 — с. Рыболово, деревни Губино и Березкино; 19 — деревни Романовка и Петрово; 20 — с. Ярское, дер. Магадаево; 21 — села Малиновка и Коларово, дер. Просекино, с. Богашево, окр. г. Томска; 22 — дер. Большое Протопопово, с. Омутное, деревни Мазалово и Подломск, с. Корнилово; 23 — дер. Поросино, пос. Молодежный; 24 — села Курлек, Октябрьское, Вершинино и с. Кафтанчиково; 25 — дер. Милоновка; 26 — пос. Заречный (Межениновское сельское поселение); 27 — с. Ново-Ивановское. Пасеки расположенные на расстоянии менее 20 км, обозначены одной точкой.

Fig. 1. Distribution of *Nosema* in honeybee colonies in Tomsk Province (dots 1—27).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Зараженность микроспоридиями рода *Nosema* медоносных пчел

Нозематоз был зарегистрирован на 20 (31.3 % от общего количества) из 64 пасек, наличие возбудителей этого заболевания было выявлено у 32 (25.8 %) из 124 пчелосемей. В период с 2012 по 2015 г. зараженность как пчелосемей, так и пасек микроспоридиями рода *Nosema* изменялась от 0 % в 2012 г. до 42—46 % в 2014 и 2015 гг. (табл. 1). Причины этих изменений могут быть обусловлены особенностями сбора материала, погодными условиями разных лет и другими факторами. Например, 2012 г. отличался высокими температурами и низкой влажностью в летний период, что могло послужить причиной отсутствия нозематоза. С учетом данных за 2009—2010 гг., изменения зараженности нозематозом пчелосемей и пасек имеет «волнообразный» характер. Исследования, проведенные в 2009—2015 гг. на пасеках Томской обл., свидетельствуют о довольно широком распространении возбудителя нозематоза и значительном возрастании количества пчелосемей и пасек, зараженных микроспоридиозом за последние 2 года.

Таблица 1

Зараженность микроспоридиями рода *Nosema* пчелосемей и пасек Томской обл. за период 2009—2015 гг.

Table 1. Infestation of honeybee colonies and apiaries of Tomsk Province by *Nosema* in 2009—2015

Единица наблюдения	Количество (всего, шт./заражено, шт. (%))					
	2009 г.	2010 г.	2012 г.	2013 г.	2014 г.	2015 г.
Пчело-семья	89/3 (3.4)	84/8 (9.5)	15/0 (0)	49/7 (14.3)	39/16 (41.0)	21/9 (42.9)
Пасека	11/2 (18.2)	21/8 (38.1)	6/0 (0)	25/5 (20.0)	26/11 (46.2)	19/8 (42.1)

Распространение микроспоридий *N. apis*, *N. ceranae* на пасеках Томской обл.

С целью определения *Nosema apis* и *N. ceranae* был использован метод мультиплексной ПЦР, позволяющий в одном эксперименте установить видовую принадлежность паразита. ПЦР-анализ был проведен для 32 пчелиных семей, у пчел которых были методом световой микроскопии предварительно выявлены споры ноземы. Использованы видоспецифичные праймеры для 16S рДНК *N. apis* и *N. ceranae* (Martín-Hernández et al., 2007; Hamiduzzaman et al., 2010) (рис. 2).

С помощью молекулярно-генетических методов показано, что из 32 пчелосемей, зараженных спорами ноземы, в 27 семьях (84.4 % от общего количества исследованных пчелосемей) присутствовал возбудитель *N. apis*, в 3 семьях (9.4 %) — *N. ceranae* и в 2 семьях (6.3 %) отмечалась смешанная инфекция, представленная обоими возбудителями.

В образцах пчел с 16 пасек (80.0 % от числа зараженных) выявлены только споры *N. apis*; у пчел, изъятых с 2 пасек (вблизи сел Курлек и Бат-кат) (10.0 % от числа зараженных), обнаружен только возбудитель нозематоза типа «С» — *N. ceranae*. На 2 пасеках (вблизи пос. Заречный и в окр. Томска) (10.0 % от числа зараженных) у пчел выявлены оба возбудителя нозематоза. Формы наиболее патогенного возбудителя нозематоза были впервые выявлены в 2013 г. на пасеке вблизи с. Курлек (Томский р-н)

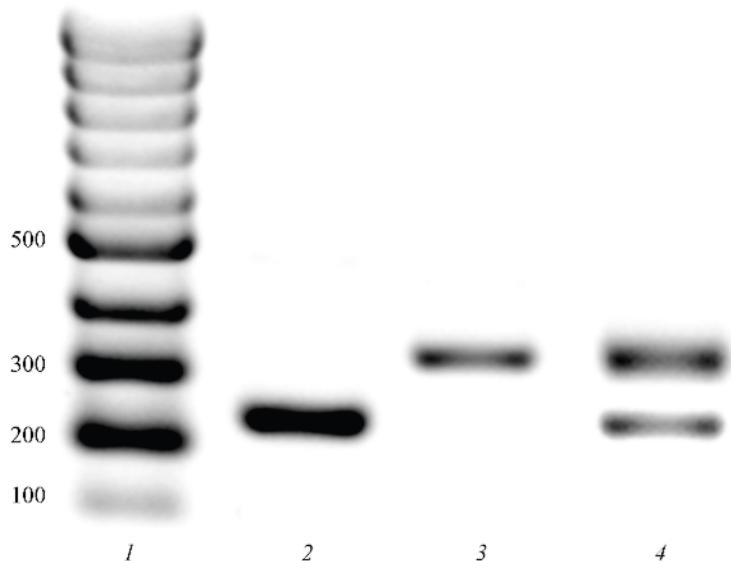


Рис. 2. Результаты электрофоретического разделения продуктов мультиплексной ПЦР со специфическими праймерами для 16S рДНК с целью выявления вида ноземы (праймеры 218 MITOC специфичны для *Nosema ceranae*, 321 APIS — для *Nosema apis*).

Дорожки: 1 — маркер длин фрагментов ДНК, леддер 100 п. н.; 2 — ПЦР-продукт, соответствующий *N. ceranae*; 3 — ПЦР-продукт, соответствующий *N. apis*; 4 — ПЦР-продукт, включающий оба вида ноземы (ко-инфекция).

Fig. 2. Multiplex-PCR amplification of representative bee samples infected with *Nosema ceranae* and *Nosema apis* using primers 218 MITOC specific for *N. ceranae* and 321 APIS specific for *N. apis*.

(Островерхова и др., 2014) и позднее, в 2014 г., — на пасеке в окрестностях с. Баткат (Шегарский р-н). Еще 2 случая заражения пчелосемей спорами *N. ceranae* были отмечены в 2015 г. на пасеках в окр. Томска и в пос. Заречный в начале пчеловодческого сезона.

Полученные результаты позволяют заключить, что в 2014 и в 2015 гг. наблюдается увеличение общего количества зараженных пчелосемей и пасек спорами ноземы. Кроме того, в эти годы на территории Томской обл. отмечалось более широкое распространение *N. ceranae*, являющегося более патогенным видом (рис. 1). Особи, зараженные *N. ceranae*, поступили или из одного пчелопитомника карпатской породы (пасеки с. Баткат и в окр. Томска), или были производными от уже завезенных из него ранее семей (с. Курлек). Неясной остается причина появления нозематоза «С» на пасеке пос. Заречный. Здесь были выявлены как *N. apis*, так и *N. ceranae*. По информации, полученной от пчеловода, на данную пасеку пчелосемьи в течение последних 5 лет не завозились, а другие пасеки поблизости отсутствуют.

Таким образом, нозематоз обнаружен на пасеках, расположенных на территории 5 районов (Томского, Шегарского, Асиновского, Зырянского и Чайнского) из 11 обследованных. При этом большая часть зараженных пчелосемей обитала на пасеках из южных районов Томской обл. Среди обследованных пасек северных районов только на одной пасеке вблизи с. Подгорное (Чайнский р-н) была обнаружена *N. apis* (рис. 1), но в данном случае зараженные пчелосемьи с большой вероятностью являются завезенными.

Широкое распространение нозематоза на пасеках южных районов области может быть обусловлено более развитым пчеловодством и активным завозом пчелосемей из других регионов России и соответственно более высокой вероятностью распространения инфекции на этой территории. Можно предположить, что более суровые климатические условия северных районов могут препятствовать распространению нозематоза.

В целом особенности распространения *N. apis* и *N. ceranae* на территории Томской обл. несколько отличаются от таковых в других районах страны (Зиннатуллина и др., 2012). По сравнению с прочими областями России, для которых характерно широкое распространение нозематоза, в том числе и нозематоза типа «С», в Томской обл. преобладают случаи выявления *N. apis*. За период наших наблюдений отмечалось увеличение процента зараженных пчелосемей и пасек Томской обл. нозематозом, включая случаи заражения пчел *N. ceranae* в Томском и Шегарском районах.

Данные многолетних наблюдений по зараженности микроспоридиями рода *Nosema* пчелосемей на пасеках Томской обл.

Для того чтобы установить причины заболеваемости пчелосемей и распространения нозематоза на пасеках, необходимо проводить исследование многолетней и сезонной динамики зараженности пчелиных семей. Однако такие исследования немногочисленные (Gisder et al., 2010; Runckel et al., 2011; Forsgren, Fries, 2013).

Таблица 2

Данные многолетних наблюдений по зараженности пчелосемей спорами *Nosema* на пасеках Томской обл.

Table 2. Long-term dynamics of infestation of bee colonies by *Nosema* in Tomsk Province

Населенный пункт	Количество исследованных пчелосемей, шт./ количество зараженных пчелосемей, шт.						Виды <i>Nosema</i>
	2009 г.	2010 г.	2012 г.	2013 г.	2014 г.	2015 г.	
Томский р-н							
Окр. Томска	2/2	1/1	—	1/1	—	1/1	<i>N. apis</i> и <i>N. ceranae</i>
Дер. Подломск	1/1	—	—	—	—	1/0	—
Дер. Аркашово	—	1/1	—	—	1/0	—	—
Пос. Заречный (Межениновское сельское поселение)	—	—	1/0	—	2/0	1/1	<i>N. apis</i> и <i>N. ceranae</i>
С. Коларово, пасека 1	—	—	—	2/1	2/2	—	<i>N. apis</i>
С. Коларово, пасека 2	—	—	—	1/1	1/1	—	То же
С. Березкино	—	—	—	1/0	—	1/0	—
Дер. Милоновка	—	—	—	—	1/0	1/1	<i>N. apis</i>
Дер. Кусково	—	—	—	1/0	—	1/0	—
С. Малиновка	—	—	—	1/0	1/1	1/1	<i>N. apis</i>
С. Просекино	—	—	—	4/0	—	1/0	—
Дер. Бодажково	—	—	—	—	1/1	2/2	<i>N. apis</i>
С. Омутное	—	—	—	—	7/0	1/0	—
Шегарский р-н							
С. Мельниково	52/0	35/0	—	—	—	—	—
С. Новоильинка	33/0	—	—	—	1/1	—	<i>N. apis</i>
С. Баткат	8/0	—	—	—	1/1	—	<i>N. ceranae</i>
Чаинский р-н							
С. Подгорное	—	—	—	4/0	3/3	—	<i>N. apis</i>

За период с 2009 по 2015 г. ситуация по зараженности пчелосемей спорами *Nosema* была отслежена как минимум 2 раза на 17 пасеках из 64 исследованных (табл. 2). На 5 пасеках Томского и Шегарского районов (дер. Кусково, села Березкино, Просекино, Омутное и Мельниково), что составляет 29.4 %, за все время исследований не выявлено пчел, зараженных спорами ноземы. На 8 пасеках (47.1 % от общего количества исследованных пасек) хотя бы один раз зарегистрировано наличие спор ноземы в пчелосемьях. При этом для 2 пасек (деревни Подломск и Аркашово) наблюдается положительная динамика (при повторных исследованиях пчелосемей нозематоз не обнаружен), а для 6 пасек (пос. Заречный, дер. Милоновка, села Малиновка, Новоильинка, Баткат и Подгорное) — отрицательная (обнаружение нозематоза на ранее незараженных). На 4 пасеках (23.5 %) в окр. Томска, а также сел Коларово и Бодажково во все годы наблюдений зараженные пчелосемьи регистрировались постоянно.

Отмеченные различия могут быть обусловлены отсутствием или недостаточно полными лечебными мероприятиями или, наоборот, следствием

успешной профилактики и лечения пчел, а также заменой пчелосемей. Так, на 3 пасеках (окр. Томска, села Баткат и Подгорное) нозематоз был зарегистрирован после завоза пчелосемей с других территорий. На пасеки в с. Баткат и окр. Томска пчелосемьи карпатской породы были завезены из южных районов России, и в 2014—2015 гг. на этих пасеках была обнаружена *N. ceranae*. На пасеке в с. Подгорное, начиная с 2013 г., также предпочтительно культивируется карпатская порода, которая завозится в виде пакетов из Узбекистана. Нельзя исключить, что пчелосемьи уже были приобретены инфицированными. При исследовании пасеки в с. Подгорное на заболеваемость нозематозом пчел весной 2013 г., т. е. до завоза новых пчелосемей из Узбекистана, споры ноземы обнаружены не были. Впервые споры *N. apis* выявлены у пчел здесь в 2014 г. (табл. 2).

Таким образом, на некоторых пасеках микроспоридии рода *Nosema* являются завозными и прежде всего это касается *N. ceranae*. Это указывает на необходимость обеспечения проведения карантинных мероприятий и контроля качества завозимых пчел (отсутствие зараженности нозематозом), особенно с территорий, неблагополучных по распространению нозематоза. Кроме того, актуальным представляется, во-первых, дальнейшее изучение многолетней и сезонной динамики зараженности пчелосемей и наблюдение за пчелосемьями в различных регионах; во-вторых, анализ жизнеспособности спор *N. ceranae* в разных климатических условиях, а также изучение взаимоотношений между патогенами при совместном заражении пчел и между патогенами и медоносной пчелой.

Особенности распространения двух видов ноземы — *N. apis* и *N. ceranae*

Существуют разные точки зрения по вопросу распространения у медоносных пчел 2 видов рода *Nosema*, а также на процесс вытеснения *N. apis* более патогенным *N. ceranae*. С точки зрения одних исследователей, распространение нозематоза, вызываемого *N. ceranae*, рассматривается как проблема глобального масштаба. Объясняется это тем, что возбудитель *N. ceranae*, как более агрессивный паразит, распространяется значительно быстрее, чем *N. apis* (Higes et al., 2013). Другие исследователи (Forsgren, Fries, 2010) указывают на то, что гибель пчелиных семей в результате заражения возбудителем *N. ceranae* может быть региональной проблемой, а не глобальным явлением (Genersch, 2010). Одно из основных объяснений различий в распространенности *N. ceranae* заключается в том, что вирулентность этого вида может зависеть от климатических условий (Fries, 2010; Gisder et al., 2010; Higes et al., 2010; Sánchez Collado et al., 2014; van der Zee et al., 2014). В частности, холодный климат рассматривается как один из факторов, ограничивающих распространение *N. ceranae* (Fries, 2010; Gisder et al., 2010); микроспоридии *N. ceranae* более приспособлены к высоким температурам (до 60 °C), но чувствительны к более низким (4 °C) (Fenoy et al., 2009; Fries, 2010; Gisder et al., 2010). Так, было выявлено снижение прорастания спор *N. ceranae* даже после короткого воздействия низких температур (4 °C) (Gisder et al., 2010). Поэтому снижение или отсутствие жизнеспособности спор *N. ceranae* при низких температурах

могут препятствовать распространению инфекции этого возбудителя в климатических регионах, характеризующихся довольно холодной зимой (Gisder et al., 2010).

Однако в настоящем исследовании возбудитель нозематоза *N. ceranae* был зарегистрирован в пчелиных семьях, обитающих в условиях холодного климата с продолжительной зимой и влажным летом. Вместе с тем большинство пчелосемей, зараженных *N. ceranae*, скорее всего, были завезены в Томскую обл. из других регионов страны.

Проблема распространения заболевания и вопрос о вирулентности возбудителя в разных климатических условиях представляют собой важную задачу в исследованиях паразито-хозяинных отношений «медоносная пчела—микроспории рода *Nosema*» (Genersch, 2010). Очевидно, что необходимы дополнительные исследования для выяснения влияния возбудителя *N. ceranae* на медоносных пчел в различных географических районах и определения отличий в вирулентности двух возбудителей. Томская обл., как и другие территории Сибири, могут быть идеальным местом для изучения ряда вопросов, например, насколько распространение нозематоза коррелирует с климатическими условиями, какова жизнеспособность паразита в холодном климате, а также сезонная динамика зараженности пчелосемей обоими видами ноземы — *N. apis* и *N. ceranae*. Полученные результаты свидетельствуют об актуальности дальнейших мониторинговых исследований как данного региона, так и других регионов страны с учетом видового состава паразитов.

БЛАГОДАРНОСТИ

Данное научное исследование выполнено при поддержке Программы «Научный фонд ТГУ им. Д. И. Менделеева» в 2015 г. (проект № 8.1.66.2015) и РФФИ (проект № 16-44-700902p_a).

Список литературы

Воронин В. Н., Исси И. В. 1974. О методиках работы с микроспоридиями. Паразитология. 8 (3): 272—273.

Зинатуллина З. Я., Игнатьева А. Н., Жигилева О. Н., Токарев Ю. С. 2011. «Азиатский» нозематоз в России. Пчеловодство. 10: 24—26.

Зинатуллина З. Я., Жигилева О. Н., Игнатьева А. И., Токарев Ю. С. 2012. Нозематоз медоносных пчел на пасеках России. Режим доступа: www.apeworld.ru/1353579609.html (23 декабря 2014).

Исси И. В. 1986. Микроспоридии. Протозоология. Л.: Наука. 10: 1—185.

Исси И. В. 2002. Паразитарные системы микроспоридий. Описание и вопросы терминологии. Паразитология. 36 (6): 478—492.

Лукьянцев В. В., Симакова А. В. 2014. Зараженность микроспоридиями (Microsporidia) низших ракообразных (Copepoda, Cladocera) Западной Сибири. Паразитология. 48 (5): 358—372.

Островерхова Н. В., Конусова О. Л., Кучер А. Н., Погорелов Ю. Л., Белях Е. А., Воротов А. А. 2013. Популяционно-генетическая структура медоносной пчелы (*Apis mellifera* L.) в районе д. Леботер Чайнского района Томской области. Вестн. Томск. гос. ун-та. Биология. 1 (21): 161—172.

Островерхова Н. В., Конусова О. Л., Погорелов Ю. Л., Киреева Т. Н., Салик М. Ю., Голубева Е. П. 2014. Первый случай диагностики *Nosema ceranae* на пасеке Томской области. Пчеловодство. 9: 28—30.

Симакова А. В., Панкова Т. Ф. 2008. Экология и эпизоотология микроспоридий малярийных комаров (Diptera: Culicidae) юга Западной Сибири. Паразитология. 42 (2): 139—149.

Симакова А. В., Лукьянцев В. В., Vossbrinck C. R., Andreadis T. G. 2011. Выявление *Amblyospora rugosa* и *Trichoctospora pygopellita* (Microsporidia: Amblyosporidae), микроспоридий — паразитов кровососущих комаров, у *Acanthocyclops venustus* и *Acanthocyclops reductus* (Copepoda: Cyclopoidae), основанное на анализе малой субъединицы рибосомальной ДНК. Паразитология. 45 (2): 140—146.

Токарев Ю. С., Воронин В. Н., Сендерский И. В., Иесси И. В. 2015. Микроспоридия *Glugea gasterostei* Voronin 1974 (Microsporidia: Marinospordia) из трехглой колюшки *Gasterosteus aculeatus* (Actinopterygii: Gasterosteiformes) как самостоятельный вид. Паразитология. 49 (2): 81—92.

Чернышев А. А. 2012. Усовершенствование метода диагностики нозематоза медоносных пчел. Автореф. дис. ... канд. биол. наук. М. 21 с.

Becnel J. J., Andreadis T. G. 2014. Microsporidia in insects. In: M. Witter and J. J. Becnel (eds). Microsporidia: Pathogens of Opportunity. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New York. 521—570.

Botias C., Martín-Hernandez R., Barrios L., Meana A., Higes M. 2013. *Nosema* spp. Infection and its negative effects on honey bees (*Apis mellifera iberiensis*) at the colony level. Veterinary Research. 44 (1): 25.

Büchler R., Costa C., Hatjina F., Andonov S., Meixner M. D., le Conte Y., Uzunov A., Berg S., Bienkowska M., Bouga M., Drazic M., Dyrba W., Kryger P., Panasiuk B., Pechhacker H., Petrov P., Kezic N., Korpela S., Wilde J. 2014. The influence of genetic origin and its interaction with environmental effects on the survival of *Apis mellifera* L. colonies in Europe. Journal of Apicultural Research. 53 (2): 205—214.

Chauzat M. P., Higes M., Martín-Hernández R., Meana A., Cougoule N., Fauchon J. P. 2007. Presence of *Nosema ceranae* in French honey bee colonies. Journal of Apicultural Research. 46: 127—128.

Chen Y. P., Evans J. D., Smith I. B., Pettis J. S. 2008. *Nosema ceranae* is a long-present and wide-spread microsporidian infection of the European honey bee (*Apis mellifera*) in the United States. Journal of Invertebrate Pathology. 97: 186—188.

Chen Y. P., Evans J. D., Murphy C., Gutell R., Zuker M., Gundesen-Rindal D., Pettis J. S. 2009. Morphological, molecular, and phylogenetic characterization of *Nosema ceranae*, a microsporidian parasite isolated from the European honey bee, *Apis mellifera*. Journal of Eukaryotic Microbiology. 56: 142—147.

Chen Y. P., Huang Z. Y. 2010. *Nosema ceranae*, a newly identified pathogen of *Apis mellifera* in the USA and Asia. Apidologie. 41: 364—374.

Chen Y. P., Pettis J. S., Zhao Y., Liu X., Tallon L. J., Sadzewicz L. D., Li R., Zheng H., Huang S., Zhang X., Hamilton M. C., Pernal S. F., Melathopoulos A. P., Yan X., Evans J. D. 2013. Genome sequencing and comparative genomics of honey bee microsporidia, *Nosema apis* reveal novel insights into host-parasite interactions. BMC Genomics. 14: 451—467.

Cornman R. S., Chen Y. P., Schatz M. C., Street C., Zhao Y., Desany B., Egholm M., Hutchison S., Pettis J. S., Lipkin W. I., Evans J. D. 2009. Genomic analyses of the microsporidian *Nosema ceranae*, an emergent pathogen of honey bees. PLoS Pathogens. 5 (6): e1000466.

Cox-Foster D. L., Conlan S., Holmes E. C., Palacios G., Evans J. D., Moran N. A., Quan P.-L., Briese S., Hornig M., Geiser D. M., Martinson V., van Engelsdorp D., Kalkstein A. L., Drysdale L., Hui J., Zhai J., Cui L., Hutchison S., Simons J. F., Egholm M., Pettis J. S., Lipkin W. I. 2007. A metagenomic survey of microbes in honey bee colony collapse disorder. Science. 318: 283—287.

Eiri D. M., Suwannapong G., Endler M., Nieh J. C. 2015. *Nosema ceranae* can infect honey bee larvae and reduces subsequent adult longevity. *Plos One*. 10 (5): e0126330.

Fenoy S., Rueda C., Higes M., Martín-Hernández R., del Aguila C. 2009. High-level resistance of *Nosema ceranae*, a parasite of the honeybee, to temperature and desiccation. *Applied Environmental Microbiology*. 75 (21): 6886—6889.

Forsgren E., Fries I. 2010. Comparative virulence of *Nosema ceranae* and *Nosema apis* in individual European honey bees. *Veterinary Parasitology*. 170 (3—4): 212—217.

Forsgren E., Fries I. 2013. Temporal study of *Nosema* spp. in a cold climate. *Environmental Microbiology Reports*. 5 (1): 78—82.

Francis R. M., Amiri E., Meixner M. D., Kryger P., Gajda A., Andonov S., Uzunov A., Topolska G., Charistos L., Costa C., Berg S., Bienkowska M., Bouga M., Büchler R., Dyrba W., Hatjina F., Ivanova E., Kezic N., Korpela S., le Conte Y., Panasiuk B., Pechhacker H., Tsoktouridis G., Wilde J. 2014. Effect of genotype and environment on parasite and pathogen levels in one apiary — a case study. *Journal of Apicultural Research*. 53 (2): 230—232.

Fries I. 1988. Infectivity and multiplication of *Nosema apis* Z. in the ventriculus of the honey bee. *Apidologie*. 19: 319—328.

Fries I., Feng F., da Silva A., Slemenda S. B., Pieniazek N. J. 1996. *Nosema ceranae* n. sp. (Microspora, Nosematidae), morphological and molecular characterization of a microsporidian parasite of the Asian honey bee *Apis cerana* (Hymenoptera, Apidae). *European Journal Protistology*. 32: 356—365.

Fries I., Martin R., Meana A., Garcia-Palencia P., Higes M. 2006. Natural infections of *Nosema ceranae* in European honey bees. *Journal of Apicultural Research*. 45: 230—233.

Fries I. 2010. *Nosema ceranae* in European honey bees (*Apis mellifera*). *Journal of Invertebrate Pathology*. 103 (1): S73—S79.

Genersch E. 2010. Honey bee pathology: current threats to honey bees and beekeeping? *Applied Microbiology and Biotechnology*. 87: 87—97.

Giersch T., Berg T., Galea F., Hornitzky M. 2009. *Nosema ceranae* infects honey bees (*Apis mellifera*) and contaminates honey in Australiá. *Apidologie*. 40: 117—123.

Gisder S., Hettke K., Möckel N., Frieling M. C., Linde A., Genersch E. 2010. Five-year cohort study of *Nosema* spp. in Germany: does climate shape virulence and assertiveness of *Nosema ceranae*? *Applied Environmental Microbiology*. 76 (9): 3032—3038.

Goblirsch M., Huang Z. Y., Spivak M. 2013. Physiological and behavioral changes in honey bees (*Apis mellifera*) induced by *Nosema ceranae* infection. *PloS One*. 8 (3): e58165.

Hamiduzzaman M. Md., Guzman-Novoa E., Goodwin P. H. 2010. A multiplex PCR assay to diagnose and quantify *Nosema* infections in honey bees (*Apis mellifera*). *Journal of Invertebrate Pathology*. 105 (2): 151—155.

Higes M., Martín-Hernández R., Meana A. 2006. *Nosema ceranae*, a new microsporidian parasite in honeybees in Europe. *Journal of Invertebrate Pathology*. 92: 93—95.

Higes M., Martín-Hernández R., Botías C., Garrido-Bailón E., González-Porto A. V., Barrios L., del Nozal M. J., Bernal J. L., Jiménez J. J., García-Palencia P., Meana A. 2008. How natural infection by *Nosema ceranae* causes honeybee colony collapse. *Environmental Microbiology*. 10 (10): 2659—2669.

Higes M., Martín-Hernández R., Garrido-Bailón E., Botías C., Meana A. 2009. The presence of *Nosema ceranae* (Microsporidia) in North African honey bees (*Apis mellifera intermissa*). *Journal of Apicultural Research*. 48: 217—219.

Higes M., García-Palencia P., Botías C., Meana A., Martín-Hernández R. 2010. The differential development of microsporidia infecting worker honey bee (*Apis mellifera*) at increasing incubation temperature. *Environmental Microbiology Reports*. 2 (6): 745—748.

Higes M., Meana A., Bartolome C., Botías C., Martín-Hernández R. 2013. *Nosema ceranae* (Microsporidia), a controversial 21st century honey bee pathogen. *Environmental Microbiology Reports*. 5 (1): 17—29.

Huang W. F., Jiang J. H., Chen Y. W., Wang C. H. 2007. A *Nosema ceranae* isolate from the honeybee *Apis mellifera*. *Apidologie*. 38: 30—37.

Huang W. F., Solter L., Aronstein K., Huang Z. 2015. Infectivity and virulence of *Nosema ceranae* and *Nosema apis* in commercially available North American honey bees. *Journal of Invertebrate Pathology*. 124: 107—113.

Invernizzi C., Abud C., Tomasco I. H., Harriet J., Ramallo G., Campá J., Katz H., Gardiol G., Mendoza Y. 2009. Presence of *Nosema ceranae* in honeybees (*Apis mellifera*) in Uruguay. *Journal of Invertebrate Pathology*. 101: 150—153.

Klee J., Besana A. M., Genersch E., Gisder S., Nanetti A., Tam D. Q., Chinh T. X., Puerta F., Ruz J. M., Kryger P., Message D., Hatjina F., Korpela S., Fries I., Paxton R. J. 2007. Widespread dispersal of the microsporidian *Nosema ceranae*, an emergent pathogen of the western honey bee, *Apis mellifera*. *Journal of Invertebrate Pathology*. 96: 1—10.

Martín-Hernández R., Meana A., Prieto L., Salvador A. M., Garrido-Bailón E., Higes M. 2007. Outcome of colonization of *Apis mellifera* by *Nosema ceranae*. *Applied and Environmental Microbiology*. 73 (20): 6331—6338.

Meixner M. D., Büchler R., Costa C., Francis R. M., Hatjina F., Kryger P., Uzunov A., Carreck N. L. 2014a. Honey bee genotypes and the environment. *Journal of Apicultural Research*. 53 (2): 183—187.

Meixner M. D., Francis R. M., Gajda A., Kryger P., Andonov S., Uzunov A., Topolska G., Costa C., Amiri E., Berg S., Bienkowska M., Bouga M., Büchler R., Dyrba W., Gurgulova K., Hatjina F., Ivanova E., Janes M., Kezic N., Korpela S., le Conte Y., Panasiuk B., Pechhacker H., Tsoktouridis H., Vaccari G., Wilde J. 2014b. Occurrence of parasites and pathogens in honey bee colonies used in a European genotype-environment interactions experiment. *Journal of Apicultural Research*. 53 (2): 215—229.

Milbrath M. O., van Tran T., Huang W. F., Solter L. F., Tarpy D. R., Lawrence F., Huang Z. Y. 2015. Comparative virulence and competition between *Nosema apis* and *Nosema ceranae* in honey bees (*Apis mellifera*). *Journal of Invertebrate Pathology*. 125: 9—15.

Mulholland G. E., Traver B. E., Johnson N. G., Fell R. D. 2012. Individual variability of *Nosema ceranae* infections in *Apis mellifera* colonies. *Insects*. 3: 1143—1155.

Paxton R. J., Klee J., Korpela S., Fries I. 2007. *Nosema ceranae* has infected *Apis mellifera* in Europe since at least 1998 and may be more virulent than *Nosema apis*. *Apidologie*. 38: 558—565.

Paxton R. J. 2010. Does infection by *Nosema ceranae* cause «Colony Collapse Disorder» in honey bees (*Apis mellifera*)? *Journal of Apicultural Research*. 49 (1): 80—84.

Peng Y., Baer-Imhof B., Millar A. H., Baer B. 2015. Consequences of *Nosema apis* infection for male honey bees and their fertility. *Scientific Reports*. 5: 10 565.

Runckel C., Flenniken M. L., Engel J. C., Ruby J. G., Ganem D., Andino R., de Risi J. L. 2011. Temporal analysis of the honey bee microbiome reveals four novel viruses and seasonal prevalence of known viruses, *Nosema*, and *Crithidia*. *PLoS One*. 6 (6): e20656.

Santrac V., Granato A., Mutinelli F. 2010. Detection of *Nosema ceranae* in *Apis mellifera* from Bosnia and Herzegovina. *Journal of Apicultural Research*. *Bee World*. 49 (1): 100—101.

Shafer A. B. A., Williams G. R., Shutler D., Rogers R. E. L., Stewart D. T. 2009. Cophylogeny of *Nosema* (Microsporidia: Nosematidae) and bees (Hymenoptera: Apidae) suggests both cospeciation and a host-switch. *Journal of Parasitology*. 95: 198—203.

Sánchez Collado J. G., Higes M., Barrio L., Martín-Hernández R. 2014. Flow cytometry analysis of *Nosema* species to assess spore viability and longevity. *Parasitology Research*. 113 (5): 1695—1701.

van der Zee R., Gómez-Moracho T., Pisa L., Sagastume S., García-Palencia P., Maside X., Bartolome C., Martín-Hernández R., Higes M. 2014. Virulence and polar tube protein genetic diversity of *Nosema ceranae* (Microsporidia)

field isolates from Northern and Southern Europe in honeybees (*Apis mellifera iberiensis*). *Environmental Microbiology Reports*. 6 (4): 401—413.

Vavilova V., Sormacheva I., Woyciechowski M., Eremeeva N., Fet V., Strachecka A., Bayborodin S. I., Blinov A. 2015. Distribution and diversity of *Nosema bombi* (Microsporidia: Nosematidae) in the natural populations of bumblebees (*Bombus* spp.) from West Siberia. *Parasitology Research*, DOI 10.1007/s00436-015-4562-4.

Vidau C., Panec J., Texier C., Biron D. G., Belzunces L. P., le Gall M., Brousseau C., Delbac F., El Alaoui H. 2014. Differential proteomic analysis of midguts from *Nosema ceranae*-infected honeybees reveals manipulation of key host functions. *Journal of Invertebrate Pathology*. 121: 89—96.

Williams G. R., Shafer A. B. A., Rogers R. E. L., Shutler D., Stewart D. T. 2008. First detection of *Nosema ceranae*, a microsporidian parasite of European honey bees (*Apis mellifera*), in Canada and central U. S. A. *Journal of Invertebrate Pathology*. 97: 189—192.

Zander E. 1909. Tierische Parasiten als Krankheitserreger bei der Biene. *Münchener Bienenzeitung*. 31: 196—204.

INFESTATION OF HONEYBEE (*APIS MELLIFERA*) FAMILIES
BY MICROSPORIDIANS OF THE GENUS *NOSEMA* IN TOMSK PROVINCE

N. V. Ostroverkhova, O. L. Konusova, A. N. Kucher, A. V. Simakova,
E. P. Golubeva, T. N. Kireeva, I. V. Sharakhov

Key words: microsporidia, *Nosema ceranae*, *Nosema apis*, honeybee, *Apis mellifera*, *Nosema* disease, the Tomsk region (Siberia).

SUMMARY

Infestation of bee colonies and apiaries by representatives of the genus *Nosema*, microsporidian protozoans of European honeybees (*Apis mellifera* L.), causing nosemosis, in Tomsk Province was investigated. In 2012—2015, nosemosis was detected in 32 out of 124 honeybee colonies (31.3 %) and in 20 out of 64 studied apiaries (25.8 %). The maximal infestation rate of bee colonies and apiaries constituted more than 40 % in 2014—2015. *N. apis* pathogen was registered in 84.4 % of infected bee colonies (16 apiaries); *N. ceranae* was identified in 9.4 % of infected bee colonies (2 apiaries); and co-infection (*N. apis* and *N. ceranae*) was detected in 6.3 % of infected bee colonies (2 apiaries). The reasons of the spreading of the nosemosis, such as climatic conditions, control of imported bee colonies on the presence of *Nosema* infection, and some others are discussed.